

PAT-NO: JP405078237A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 05078237 A
TITLE: CONTROLLED-RELEASE FORMULATION
PUBN-DATE: March 30, 1993

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

BARKER, SIDNEY A

GRAY, CHARLES J

HOFMANN, MARTIN

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

KELCO INTERNATL LTD

COUNTRY

N/A

APPL-NO: JP03216757

APPL-DATE: March 6, 1991

INT-CL (IPC): A61K009/22, A61K047/36 , A61K047/42 ,
A61K047/48

ABSTRACT:

PURPOSE: To prepare a formulation, comprising a gel matrix, a protein entrapped into the gel matrix and an ingredient capable of binding to the entrapped protein such as a drug or an antibiotic substance and capable of hydrolyzing the protein with a proteolytic enzyme and releasing the ingredient from the protein to a desired site.

CONSTITUTION: This controlled-release formulation comprises a gel matrix

(preferably polysaccharides capable of gelling such as pectin, a pectate, carrageenan or guar gum and further containing Mg, Zn, Al, etc.), a protein entrapped into the gel matrix (especially casein, blood serum albumin, etc.) and an ingredient capable of binding to the entrapped protein (a drug, an antibiotic substance, a hormone, a hormone analog, a chemotherapeutic agent, etc., are especially preferred). The formulation is designed to hydrolyze the protein with a proteolytic enzyme (trypsin, etc., are especially preferred) and release the ingredient from the protein into conditions containing an enzyme. The gel matrix is capable of assuming a shape such as a membrane, a fiber or a pipe.

COPYRIGHT: (C)1993,JPO

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-78237

(43)公開日 平成5年(1993)3月30日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
A 6 1 K 9/22	F	7329-4C		
47/36	F	7329-4C		
47/42	C	7329-4C		
	Z	7329-4C		
47/48	C	7329-4C		

審査請求 未請求 請求項の数10(全 24 頁)

(21)出願番号	特願平3-216757	(71)出願人	591186970 ケルコ インターナショナル リミテッド イギリス国, エスイー1 7アールズイー ロンドン, アルバート エンバンクメン ト, 3, ウェストミンスター タワー
(22)出願日	平成3年(1991)3月6日	(72)発明者	シドニイ アラン パーカー イギリス国, ビー29 4エヌテー パーミ ンガム, セリー オーク, アブドン アヴ エニユー 1
(31)優先権主張番号	9 0 0 4 9 5 0 . 3	(74)代理人	弁理士 岡部 正夫 (外6名)
(32)優先日	1990年3月6日		
(33)優先権主張国	イギリス (GB)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 放出制御製剤

(57)【要約】

【目的】 薬剤、食品材料又は診断用検定装置の成分の放出が制御される。

【構成】 ゲルマトリックス、ゲルマトリックスにからみついたタンパク質及びからみついたタンパク質に結合することができる成分を包含し、この製剤がタンパク質分解酵素を含む条件と反応するときにタンパク質が分解され、成分がタンパク質から酵素を含む条件に放出される放出制御製剤。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ゲルマトリックス、

ゲルマトリックスにからみついたタンパク質、及び
からみついたタンパク質に結合することができる成分を
包含し、この製剤がタンパク質分解酵素を含む条件と反
応するときにタンパク質が分解され、成分がタンパク質
から酵素を含む条件に放出される放出制御製剤。

【請求項2】 成分が薬剤、抗生物質、ホルモン、ホル
モン類似物又は化学療法剤又はその組合わせである請求
項1記載の製剤。

【請求項3】 タンパク質がカゼイン又は血清アルブミ
ン又は他のゲルにからみついたタンパク質又は
はその組合わせである請求項1記載の製剤。

【請求項4】 ゲルマトリックスがアルギン酸カルシウ
ムゲルビーズを包含している請求項1記載の製剤。

【請求項5】 ゲルマトリックスがマグネシウム、亜
鉛、銅、マンガン、アルミニウム又は鉄又はカルシウ
ム、マグネシウム、亜鉛、銅、マンガン、アルミニウム
又は鉄の混合物を有するアルギン酸塩ゲルビーズを包含
している請求項1記載の製剤。

【請求項6】 ゲルマトリックスが膜、繊維又は管形を
有する請求項1記載の製剤。

【請求項7】 ゲルがベクチン、ペクテート、カラゲニ
ン、キサンタンゴム、グアゴム、アラビアゴム、アカシ
アゴム及びカルボキシメチルセルロースからなる群から
選択される多糖類又はその混合物である請求項1記載の
製剤。

【請求項8】 1種以上のタンパク質分解酵素を請求項
1記載の放出制御製剤に添加することの特徴とする請求
項1記載の成分の放出方法。

【請求項9】 タンパク質分解酵素がトリプシンである
請求項8記載の方法。

【請求項10】 酵素が活性な患者の局所部位で成分が
放出される請求項8記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】本発明は放出制御製剤に関する。更に詳細
には本発明はゲルマトリックスに基づく製剤及びこの製
剤の例えば放出制御医薬組成物、食品添加物の放出制御
組成物又は診断用検定装置の成分としての種々の適用に
関する。所望成分がゲルマトリックスから制御された方
法で放出される種々の方法は当業界で既知である。例え
ば英国特許出願第2207353号は塩基性薬剤例えば
ベラパミルの放出制御に45重量%までのpH依存性アル
ギン酸塩例えばアルギン酸ナトリウム及び35重量%ま
でのpH依存性ヒドロコロイドゲル化剤例えばヒドロキシ
プロピルメチルセルロースを包含しているカルシウムを
含まない製剤を記載している。架橋アルギン酸塩又はカ
ラゲネン酸塩マトリックスにからみついた(entrapped)
有効成分からなる送達系は欧州特許出願第020281
9号に記載され、マトリックスからの有効成分の放出は

2

延長及び抑制されることが述べられている。有効成分が
単に架橋ゲルマトリックスにからみついたことによる製剤
は種々の欠点をもっている。例えば直径がマトリックス
孔より小さい分子、特に水溶性分子は製剤から“浸出す
る”明白な傾向がある。これは有効成分の放出を制御さ
れた方法で行なうことができる製剤の調製を困難にす
る。更にその上多くの薬剤のような高価な成分の場合、
有効成分の製剤からの早期“浸出”は著しい経済的欠点
である。そこで我々はゲルマトリックスにからみついた
タンパク質に成分を結合させる製剤を提供することによ
ってこれらの欠点を克服することができることを見出し
た。タンパク質結合成分はからみついたタンパク質の
適当な基質であるタンパク質分解酵素と製剤が接触する
ような時までマトリックスと結合したままであり、その
後タンパク質が分解して成分が放出される。

【0002】従って本発明の1態様として、ゲルマトリ
ックス、ゲルマトリックスにからみついたタンパク質、
及びからみついたタンパク質に結合することができる成
分を包含し、この製剤がタンパク質分解酵素を含む条件
と反応するときにタンパク質が分解され、成分が放出さ
れることからなる放出制御製剤を提供する。“成分”と
は製剤からの放出が制御された方法で行なわれることが
望ましいいかなる物質をも意味する。適当な成分の具体
例としては、毛虫撲滅剤、除草剤、殺菌剤(germicides,
biocides)、殺藻剤、殺鼠剤、殺真菌剤、殺虫剤、抗酸
化剤、植物生長促進剤、植物生長阻害剤、防腐剤、消毒
剤、滅菌剤、触媒、化学反応剤、発酵剤、食品、食品補
助剤、食品添加物、栄養素、化粧品、薬剤、ビタミン
剤、避妊薬、受精阻害剤、受精促進剤、空気清浄剤、微
生物弱毒剤及び食品色素のような指示物質がある。から
みついたタンパク質がタンパク質分解酵素に対して適当
な基質であることが理解されなければ製剤から成分の放
出は望ましい場所で起こらないであろう。またタンパク
質は勿論ゲルマトリックスにからみついたことができな
ければならない。しかしながらこれらの要件の他にタンパ
ク質及びタンパク質分解酵素の種類に関する制限は予想
されない。タンパク質分解酵素は生存しているヒト又は
動物体内に存在することができまた試験管内で分離及び
／又は精製した形態で使用することができる。従って本
発明による放出制御製剤は応用範囲に添うことができ
る。

【0003】従って本発明の別の態様としては、ゲルマ
トリックス、ゲルマトリックスにからみついたタンパク
質、からみついたタンパク質に結合することができる薬
剤、及び任意の医薬的に使用し得る賦形剤を包含し、こ
の組成物がタンパク質分解酵素を含む条件と反応すると
きにタンパク質が分解され、薬剤が放出されることから
なる放出制御医薬組成物を提供する。本明細書で用いら
れる“薬剤”とは哺乳類、ヒト及び霊長動物を含む動物
に局部的又は全身作用を生じるあらゆる生理的及び薬理

的有効物質を包含する。従って個々の動物としては羊、山羊、牛、馬及び豚のような家畜用、狩猟用又は農場用の動物及びマウス、ラット及びモルモットのような実験動物並びに魚、鳥、爬虫類及び他の動物園の動物を包含する。使用される薬剤の唯一の要件はからみついたタンパク質に対する結合能であることは理解されるであろう。従って原則として使用し得るタンパク質が結合するであろうことがわかればいかなる既知の薬剤も使用することができる。“使用し得るタンパク質”はゲルマトリックスにからみつくとすることができるタンパク質を意味する。有益な薬剤の具体例はマックバブリッシング社、イーストン、ペンシルバニア、米国によって発行されたレミントンズファーマソイチカルサイエンス、第17版、1985年及びマクミラン、ロンドンにより発行されたグッドマン及びギルマン、ザファーマコロジカルベーススオブセラボイイクス、第7版、1985年に開示されている。

【0004】使用することができる有効な薬剤は末梢神経、アドレナリン作動性受容体、コリン作動性受容体、神経系、骨格筋、心臓血管系、平滑筋、血液循環系、シナプス部位、神経エフェクター結合部位、内分泌及びホルモン系免疫系、生殖系、骨格系、オータコイド系及び消化及び排泄系並びにオータコイドインヒビター及びヒスタミン系に作用する無機及び有機化合物を包含する。好適な薬剤の具体例としては中枢神経系に作用する物質例えばベントバルビタールナトリウム、フェノバルビタール、セコバルビタール、チオペンタール及びその組合わせを含む催眠薬及び鎮静剤；ジオキソビペリジン及びグルタルイミドのような複素環式催眠薬及び鎮静剤；ジエチルイソバレリアミド及び α -プロモイソバレリル尿素に例示されるアミド及び尿素のような催眠薬及び鎮静剤；ウレタン及びジサルフェン催眠薬及び鎮静剤；イソコボキサジド、ニアラミド、フェネルジン、イミプラミン、塩酸アミトリアチリン、トラニルシプロミン、パーズレン及び塩酸アロトリアチリンのような精神賦活薬；クロロプロマジン、プロマジン、フルフェナジン、レセルピン、デセルピジン、メプロバメート及びベンゾジアゼピン即ちクロルジアゼポキシドのような精神安定剤；アリミドン、エニタバス、ジフェニルヒダントイン、エチルチオン、フェネツリド及びエトスキシイミドのような抗痙攣薬；メフェネシン、メトカルバモール、シクロベンザプリン、トリヘキシルフェニジル、レボドーパ/カルビドーパ及びビペリデンのような筋弛緩物質及び抗パーキンソン剤； α -メチルドーパ、 L - β -3, 4-ジヒドロキシフェニルアラニン及び α -メチルドーパ塩酸塩2水和物のピバロイルオキシエチルエステルのような抗高血圧剤；モルフィン、コデイン、メペリジン及びナロルフィンのような鎮痛薬；アスピリン、インドメタシン、インドメタシンナトリウム3水和物、サリチルアミド、ナプロキセン、コルチシン、フェノプロフェン、

スリンダック、ジフルニサル、ジクロフェナック、インドプロフェン及びサリチルアミドナトリウムのような解熱薬及び炎症剤；プロカイン、リドカイン、マエパイン、ビペロカイン、テトラカイン及びジブカインのような局所麻酔剤；アトロピン、スコボラミン、メトスコボラミン、オキシフェノニウム及びババペリンのような鎮痙薬及び筋収縮剤； PGE_1 、 PGE_2 、 $PGF_1 \alpha$ 、 $PGF_2 \alpha$ 及びPGAのようなプロスタグランジン類；ペニシリン、テトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、クロロテトラサイクリン、クロラムフェニコール、チアベンダゾール、イベルメクチン及びスルホンアミドのような抗菌剤及び駆虫剤；4-アミノキノリン、8-アミノキノリン及びピリメタミンのような抗マラリア剤；デキサメタゾン、プレドニゾロン、コルチゾン、コルチゾール及びトリアンシノロンのようなホルモン剤；メチルテストステロン及びフルオキシメステロンのようなアンドロゲンステロイド系；17 β -エストラジオール、 α -エストラジオール、エストリオール、 α -エストラジオール3-ベンゾエート及び17-エチニルエストラジオール3-メチルエーテルのようなエストロゲンステロイド系；プロゲステロン、19-ノルプレグネ-4-エン-3, 20-ジオン、17-ヒドロキシ-19-ノル-17 α -プレグネ-5(10)-エン-20-イン-3-オン、17 α -エチニル-17-ヒドロキシ-5(10)-エストレン-3-オン及び9 β , 10 α -プレグナ-4, 6-ジエン-3, 20-ジオンのような月経前期ステロイド系；アドレナリン、塩酸フェニルプロパノールアミン、アンフェタミン、エフェドリン及びノルアドレナリンのような交感神経興奮剤；ヒドララジンのような血圧降下剤；プロカインアミド、塩酸プロカインアミド、硝酸アミル、ニトログリセリン、ジピリダモール、硝酸ナトリウム及び硝酸マンニトールのような心臓血管剤；クロロチアジド、アセタゾールアミド、メタゾールアミド、ヒドロクロロチアジド、塩酸アミロリド、フルメチアジド、エタクリン酸及びフロセミドのような利尿剤；ベフェニウム、ヒドロキシナフトエート、ジクロロフェン及びダブソンのような駆虫剤；メクロールエタミン、ウラシルマスタード、5-フルオロウラシル、6-チオグアニン及びアロカルバジンのような新生物剤；ピンドロール、プロアラノロール、ブラクトロール、メトプロロール、オキシブレノロール、チモロール、マレイン酸チモロール、アテノロール、アルブレノロール及びアセプトロールのような β -遮断薬；インシュリン、イソファンインシュリン、プロタミン亜鉛インシュリン懸濁液、グロビン亜鉛インシュリン、伸長インシュリン亜鉛懸濁液、トルブタミド、アセトヘキサミド、トラザミド及びクロルプロバミドのような低血糖剤；シメチジン及びラニチジンのような抗潰瘍剤；アスコルビン酸、ナイアシン、ニコチンアミド、葉酸、コリン、ピオチン、パントテン酸及びビタミンB₁₂のような

栄養剤；必須アミノ酸；必須脂肪；チモロール、マレイン酸チモロール、ピロカルピン、硝酸ピロカルピン、塩酸ピロカルピン、ジクロールフェナミド、アトロピン、硫酸アトロピン、スコボラミン及びサリチル酸エゼリンのような眼薬；グルコン酸カルシウム、乳酸カルシウム、塩化カリウム、硫酸カリウム、塩化ナトリウム、フッ化カリウム、フッ化ナトリウム、乳酸第一鉄、グルコン酸第一鉄、硫酸第一鉄、フマル酸第一鉄及び乳酸ナトリウムのような電解質； α -アドレナリン受容体に作用する薬剤例えば塩酸クロニジン及びキノリン及びナフチリジンカルボン酸がある。好ましい薬剤としてはテトラサイクリン系、特にクロロテトラサイクリン、デメクロサイクリン及びテトラサイクリンそのものを包含する。

【0005】薬剤は非電荷分子、分子複合体及び塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、ラウリル酸塩、パルミチン酸塩、リン酸塩、硝酸塩、ホウ酸塩、酢酸塩、マレイン酸塩、オレイン酸塩及びサリチル酸塩といった医薬的に使用し得る塩のように種々の形態であることができる。酸薬剤の場合は金属アミン又は有機カチオンの塩例えば第四級アンモニウム塩を用いることができる。好適な溶解度特性をもつエステル、エーテル及びアミドのような薬剤の誘導体は単独で用いるかまたは他の薬剤と混合することもできる。更にその上水不溶性薬剤はその水溶性誘導体形態で使用することができ、組成物からの遊離により酵素によって変換されるか又は体内pH又は他の代謝過程によってもとの形に又はその生物学的に活性な形態に加水分解される。組成物に混合される薬剤量は関与する薬剤の種類及び治療される疾病の程度等の要因による。一般に最終組成物0.05～60重量%量が適当であり5.0～50%が好ましい。

【0006】任意の医薬的に使用し得る賦形剤は組成物の製造を助け、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、タルク及びソルビトールのような通常物質を包含する。本発明による医薬組成物の顕著な利点は部位特異性である。従ってゲルマトリックスにはめ込まれるタンパク質の適当な選択によって組成物はタンパク質が基質である特定の酵素によつかるまで体内を通過する際そのままであるように処方することができる。この点でのみタンパク質が分解し、薬剤が放出される。従って薬剤は活性を意図した部位を正確に目標とすることができ、薬剤と体内の他の部位との相互作用による不利な副作用を最小にすることができる。薬剤の胃腔への放出を最小にすることを確実にするために、組成物は通常の腸溶層で供給することができる。腸溶層又は腸溶皮に対して種々の物質を用いることができ、このような物質としては多くの重合体酸及び重合体とセラック、セチルアルコール及びセルロースアセテートのような物質を包含する。本発明は経口投与し得る医薬組成物に限定されず、その範囲内には局所、直腸及び非経口投与のための医薬組成物を同様に包含する。組成物は好ましくは錠剤、丸剤、カ

プセル剤、坐薬、散剤、顆粒剤又は無菌の非経口液剤又は懸濁液剤のような単位投薬形にあり、例えばレミントンズファーマソイチカルサイエンス、第17版、1985年に記載される当業界で既知の方法によって処方することが便利である。

【0007】別の態様として本発明は、ゲルマトリックス、ゲルマトリックスにからみつけたタンパク質、及びからみつけたタンパク質に結合することができる食品添加物を包含し、この組成物がタンパク質分解酵素を含む条件と反応するときにタンパク質が分解され、食品添加物が放出されることからなる食品添加物の放出制御のための組成物を提供する。"食品添加物"とは本明細書では最も広い意味で用いられる。特にこの表現は香味剤、香料、着色剤及び甘味剤及びその組合わせのようなものを包含する。前のように唯一の要件は食品添加物がからみつけたタンパク質に結合することができるというものである。本発明による食品添加物を含む組成物は、種々のチューインガムを含む製品又は賦形剤及び菓子類、食品、タバコ及び鋳り歯磨及び義歯接着剤のような専売品に使用することができる。この組成物は延長した時間で漸次香味の放出を必要とする製品に特に十分に適合する。従って最初に短時間かんだだけで急速に香味感覚が失われることがよく知られているチューインガムのような製品に持続した香味を与えるために特に有利に使用することができる。上の組成物が適用される他の事情としては加工サイクルの期間中持続して一定の成分を放出することが望まれる食品加工業及び特定の香味成分が不安定で分解しやすい事情を包含する。例えばドライミックスデザートは不安定な香味成分を含ませることができ、この場合には関与する成分はミルクを加えるときにそのまま放出されるべきであり、製品の使用前に分解されないことが望ましいことは明白である。

【0008】食品添加物として有用な香味剤の具体例としては、合成香味油、フルーツエッセンス及び植物、葉及び花のような原料から誘導される天然香味油並びにこれらの組合わせを包含する。個々の具体例としてはミドリハッカ油、ハッカ油、ケイヒ油及びアカモノ油（サリチル酸メチル）；レモン、オレンジ、グレープ、ライム及びグレープフルーツのような原料から誘導されるシトラス油；リンゴ、イチゴ、チェリー及びパイナップルのような原料から誘導されるフルーツエッセンス及びコラエキスのようなエキスがある。使用される香味剤の量は通常所望される香味種、ベース種及び強度のような要因を受けやすい好みの問題である。一般に最終組成物の0.05～3.0重量%の量が適当であり、0.3～1.5%の量が好ましく、0.7～1.2%が特に好ましい。有用な着色剤及び芳香剤は特にカークオマーズエンサイクロペディアオブケミカルテクノロジー、第5巻、第857～884頁に記載される食品、薬剤及び化粧品用に適しているものから選択することができる。こ

れらは1重量%まで好ましくは0.6重量%までの量で混合することができる。適当な甘味剤としては単糖類、二糖類及び多糖類例えばキシロース、リボース、グルコース、マンノース、ガラクトース、フルクトース、デキストロース、スクロース、転化糖、マルトース、部分的加水分解デンプン又はコーンシロップ固形分及び糖アルコール類例えばソルビトール、キシリトール、マンニトール、ジヒドロカルコン、グリシリジン及びステビアレバウジアナ(ステビオニド)のような水溶性天然甘味剤;可溶性サッカリン塩即ち、サッカリンナトリウム又はカルシウム塩、シクラメート塩、サッカリンの遊離酸体及び合成甘味剤3,4-ジヒドロ-6-メチル-1,2,3-オキシサチアジン-4-オン2,2-ジオキシド、特にそのカリウム(アセスルファメーK)、ナトリウム及びカルシウム塩のような水溶性人工甘味剤;L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステルのようなジペプチドベース甘味剤;及びその混合物を包含する。一般に用いられる甘味剤の量は個々の組成物の所望の甘味によって異なる。この量は容易に抽出し得る甘味剤を用いるとき通常0.01~90重量%である。水溶性の天然甘味剤は好適には最終組成物の25~75重量%、特に50~65重量%の量で用いられる。対照的に水溶性の人工甘味剤及びジペプチドベース甘味剤は好適には最終組成物の0.01~5.0重量%特に0.05~0.5重量%の量で用いられる。これらの量は香油から得られる香味レベルと独立して所望の甘味レベルを得ることを必要とする。

【0009】本発明による放出制御製剤の組成の適当な選択によって成分のタンパク質分解酵素を含む条件への放出が時間に関してまたタンパク質分解酵素の濃度に関して直線的にすることができることを見出した。このようにして成分の典型的組成物からの放出を検定することができる。従って本発明による製剤の別の適用は診断用検定装置の一成分としてのものである。従って別の態様として本発明は、ゲルマトリックス、ゲルマトリックスにからみついたタンパク質、及びからみついたタンパク質に結合することができる指示物質を包含し、この成分がタンパク質分解酵素と反応するときにタンパク質が分解され、指示物質が放出されることからなる診断用検定装置の成分を提供する。使用する場合、上で定義した成分は適当な容器中液体例えば水のような適当な媒質中に入れられる。検定によって決定されるタンパク質分解酵素量を含む試料は既に上澄み液に存在するか又は順次導入される。成分中からみついたタンパク質は検定試料のタンパク質分解酵素の濃度による指示物質の直線的放出を得るように選択される。タンパク質分解酵素によりからみついた基質タンパク質が分解する際、指示物質はタンパク質分解酵素の濃度によって決定された割合で上澄み液に放出される。次いで指示物質の上澄み液への放出は当業界で既知の適当なセンサー手段によって監視

されて、もとの検定試料のタンパク質分解酵素濃度の正確な指示を得る。

【0010】本発明による診断用検定成分で用いるのに適した指示物質は、色素生成分子、蛍光発生分子及び発光分子を包含する。これらの物質の上澄み液への放出は蛍光及び発光の蓄積を生じ、通常の化学ルミネッセンス装置のような適当なセンサー手段によって検出、監視することができる。個々の指示物質としてはエリスロシン、エバンスブルーバイタル(EBV)、メチルグリーン、ローズベンガル、アクリジンオレンジ、トロパエオリンOO、メチルオレンジ、酸オレンジ12、アミドブラック10B、カルミン酸ナトリウム塩、カルモシン、タートラジン及びメチレンブルー、特にエリスロシン及びEBVのような食品色素を包含する。検定成分に存在する指示物質の量は一般に用いられる検出手段によって観察される強度による。一般に使用される量は最終成分の0.001~0.2重量%、好ましくは0.01~0.04%で適当に異なる。上述の検定成分は検定されるタンパク質分解酵素がトリプシン、キモトリプシン、カリクレイン、高アルカリ性プロテアーゼ(HAP、特にHAP-PB92)及びエラスターゼのようなエンドプロテアーゼであるとき特に十分に即ち最適な直線関係を得るように作用することを見出した。検定されるタンパク質分解酵素がエキソプロテアーゼ例えばカルボキシペプチダーゼ又はアミノペプチダーゼであるとき、検定成分はなお有効であるが、開始時間の遅れを受ける。これはからみついたタンパク質が1度に1種のアミノ酸だけを分解するので指示物質が結合する個々のアミノ酸に達する時間まで指示物質が媒質中に放出されないためである。

【0011】本発明による放出制御製剤に存在させるゲルマトリックスはゲル化する多糖類が適当である。適当なゲル化する多糖類の具体例としてはカルボキシメチルセルロース、カラゲニン、グアゴム、アラビアゴム(gum arabic, gum acacia)及びポリウロネートを包含する。個々のポリウロネートとしてはアルギン酸塩、ペクチン酸塩及びキサンタンゴム、好ましくはアルギン酸塩を包含する。藻から誘導されるアルギン酸塩は4,000~約18,000の分子量を有するD-マンヌロン酸とL-グルロン酸の長鎖共重合体である。ゲル化特性を表わすためにアルギン酸塩は多価カチオンを含む塩の形態でなければならない。適当な多価カチオンの具体例としてはカルシウム、マグネシウム、亜鉛、銅、マンガン、アルミニウム及び鉄及びその組合わせを包含する。好ましい多価カチオンはカルシウム及び亜鉛及びその組合わせである。アルギン酸塩の1価の塩は水溶性であり、従ってゲル化に直接使用されない。しかしながら1価のカチオンは多価カチオンに容易に置き換えられるので1価のアルギン酸塩はゲル化する多価アルギン酸塩への有用な前駆体として働くことができる。ゲル化剤として多価ア

ルギン酸塩を用いることに由来する別の利点は使用される多価カチオンが有効成分を結合するのに助けられることができることである。例えばテトラサイクリンは2価の金属イオン特に Ca^{2+} イオンに結合することがよく知られており、この結合はテトラサイクリン分子がからみついたタンパク質に結合すると共にゲルマトリックスの全体の完全性に有利に寄与する。

【0012】本発明による放出制御製剤の使用に適当なタンパク質の具体例としてはカゼイン及びアルブミンを包含する。これらの各タンパク質は種々の成分に結合することができ、エンドプロテアーゼによって分解可能であり、制御された方法で有効成分を放出することができる。アルブミンの使用はこのタンパク質が多くの薬剤と複合体を生成することが既知であるため特に有利である。アルブミンをからみついたタンパク質として用い、ゲル化剤が多価アルギン酸塩である場合、この多価カチオンは Zn^{2+} が有利である。またカゼインをからみついたタンパク質として用い、ゲル化剤が多価アルギン酸塩である場合、使用されるカチオンは Ca^{2+} 又は Zn^{2+} 又はその組合わせが有利である。

【0013】本発明による放出制御製剤の外観は一般に関与する個々の製剤が置かれる適用によって決定される。従ってこの製剤は適切な技術で通常用いられる適当な形として存在させることができる。代表的な形としてはビーズ、ペレット、膜、繊維及び管を包含する。このような形の製造には例えばレミントンズファーマソイチカルサイエンス、第17版、1985年に記載される標準技術を使用することができる。更にその上、製剤をビーズ又はペレットの形で存在させる場合、これらは当業界で既知の方法によって調製される硬ゼラチンカプセルに含ませることが有利である。典型的なビーズ又はペレットは直径0.5~4mmであり、これは直径4mm以上の粒子から生成される組成物が胃に停滞する傾向があって局所的な望ましくない副作用を生じる可能性があることから医薬用途に特に有利である。

【0014】更に本発明は製剤からの放出が制御された方法で行なわれることが好ましいタンパク質とこれに結合することができる成分をゲル化剤と混合し、後者が結合した成分と一緒にタンパク質にからみついたゲルマトリックスを生成することを特徴とする上で定義した放出制御製剤の製造方法を提供する。上述した方法で使用される成分の割合は最終生成物に必要とされるものに反映される。最終製剤に混合する適当な有効成分の量は既に上に示されている。有利に使用されるタンパク質に対するゲル化剤の割合は0.5:1~10:1(重量)、好ましくは1:1(重量)である。使用されるゲル化剤が多価アルギン酸塩である場合、ゲル基質は対応する1価アルギン酸塩例えばナトリウム、カリウム又はリチウム塩*

*の水溶液を多価カチオン、好ましくは塩化カルシウム又は塩化亜鉛のような2価カチオンの水溶液に滴下することが便利である。タンパク質と有効成分は1価のアルギン酸塩溶液と一緒に又は別々に加えるか又は多価カチオン溶液に既に存在させることができる。1価のアルギン酸塩溶液の滴下が多価カチオン溶液に接触するとゲルマトリックスが速かに生成し、これは結合される成分と一緒にタンパク質にからみついている。この方法の利点は滴下サイズを十分緊密な接触やイオン交換を確実にすることから最終生成物の混合が不要であることである。1価のアルギン酸塩と多価カチオンは化学量論量で混合することができるが、多価カチオンはゲルマトリックス構造内で1価カチオンを多価カチオンに実質的に完全に置き換えることを確実にするために過剰に存在させることが好ましい。従って1価のアルギン酸塩水溶液の適当な濃度は0.25~2.0重量%好ましくは1.0重量%であり、一方多価カチオンの水溶液の適当な濃度は0.5~4.0重量%好ましくは1.0~2.0重量%であることができる。成分の混合はタンパク質結合成分が揮発する温度より低い温度で行なわれることが最良である。添加は1℃~25℃の温度で好ましくは室温で行なわれることが便利である。ゲルマトリックスが生成されれば次に沈殿を浮別、洗浄及び乾燥することができる。ゲルマトリックスの乾燥は室温で風乾、又は凍結乾燥又はこれらの手法の併用といった常法で行なうことができる。一般に乾燥は25℃以下の温度で行なわれるのが最良であり、タンパク質結合成分の揮発点以上の温度に於ける乾燥が勧められないことは明瞭である。乾燥されれば得られた製剤は次に上述した適当なサイズと形をした粒子に形成することができる。そこで本発明の個々の実施態様は実施例によって更に添付の図面について記載される。

【0015】予備実施例A

アルギン酸塩ゲルビーズに於けるタンパク質の保持
水酸化ナトリウム水溶液(150cm³、0.033M)中カゼイン(5.0g)の溶液を10分間煮沸した後、冷却し、2M塩酸でpH6.0に調整し、水で250cm³に希釈し、再び0.05M塩酸でpH6.0に調整した。この溶液とアルギン酸ナトリウム溶液(2.0%w/v)の同量(各々2.5cm³)の混合液を注射針により10.0cmの高さから2%(w/v)塩化カルシウム溶液(50ml)の溶液に滴下して押出した。ビーズを形成し、上澄みの280nmに於ける吸光度を直ちに読み取り、次に間隔をおいて20時間読み取った。この実験を塩化亜鉛溶液を用い、またカゼインの代わりにウシ血清アルブミン(BSA)を用いて繰り返した。結果を以下の表1に示す。

【0016】

表1

アルギン酸亜鉛及びアルギン酸カルシウムビーズに於けるウシ血清

アルブミンとカゼインの保持

ビーズ中に保持されるタンパク質 ^a				
アルギン酸塩/アルブミン		アルギン酸塩/カゼイン		
アルギン酸 亜鉛 ^b	アルギン酸 カルシウム ^c	アルギン酸 亜鉛 ^b	アルギン酸 カルシウム ^c	
調製直後	93	56	100	99
調製1時間後	91	24	99	99
調製2時間後	91	8	98	99
調製20時間後	91	8	93	90

a 示された時間で上澄みに出なかったビーズ内に取り込まれたタンパク質の%

b ビーズの調製に使用した塩化亜鉛溶液はpH5.5とした。

c ビーズの調製に使用した塩化カルシウム溶液はpH6.0とした。

【0017】表1から、アルギン酸カルシウムビーズに取り込まれたカゼインは長時間にわたって保持されることがわかる。アルギン酸カルシウム-カゼインビーズの上澄みによる280nmに於ける吸光度測定値は最初の2時間は実質的にベアチド又はタンパク質の漏出を示さなかった。対照的にビーズに取り込まれたアルブミンは90%以上が2時間で拡散した。一方、カゼイン及びアルブミン共にアルギン酸亜鉛ビーズ中では有効に保持される。

【0018】実施例1

色素のアルギン酸塩及びアルギン酸塩/タンパク質ゲル*

*ビーズへの取り込み

1%アルギン酸ナトリウム、1%カゼイン及びエリスロシン200 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ を含む溶液を予備実施例Aで記載した通り2%塩化カルシウムに滴下した。1時間後525nmに於ける吸光度を読み取り、エリスロシン200 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ を単独で塩化カルシウム溶液に滴下することによって得た溶液の吸光度と比較した。この後者は取り込まれた色素0に名目上相当する対照とした。この実験をカゼイン非存在下で繰り返し、またカゼインの存在又は非存在下でエリスロシンの代わりにEBV、メチルオレンジ、ローズベンガル又はタルトラジンをを用いて繰り返し、上澄みの吸光度を適当な波長で読み取った。結果を以下の表2(a)に示す。またこの系を塩化カルシウムの代わりに塩化亜鉛、カゼインの代わりにアルブミンを用いて繰り返した。得られた結果を以下の表2(b)に

30 示す。

【0019】

表2

アルギン酸塩及びアルギン酸塩/タンパク質ビーズから色素の放出

(a) アルギン酸カルシウム及びアルギン酸カルシウム/カゼインビーズ

色素 (λ_{max} nm)	吸光度 標準 ^a	調製1時間後に放出された色素に 基づく上澄みの吸光度(標準の%)	
		アルギン酸カルシウム ビーズ	アルギン酸 カルシウム/カゼイン ビーズ
エリスロシン (525)	1.68	1.34(80)	0.11(7)
EBV (600)	0.465	0.33(71)	0.08(17)
メチルオレンジ (465)	0.48	0.39(81)	0.40(83)
ローズベンガル (540)	0.73	0.60(90)	0.185(25)

13			14
タルトラジン	0.97	0.955 (98)	0.955 (98)
(425)			

a アルギン酸ビーズを含まない溶液の対応する容量に
於ける色素の吸光度。 * 【0020】

(b) アルギン酸亜鉛及びアルギン酸亜鉛/アルブミンビーズ

色素 (λ_{\max} nm)	吸光度 標準 ^a	調製1時間後に放出された色素に よる上澄みの吸光度 (標準の%)	
		アルギン酸亜鉛 ビーズ	アルギン酸亜鉛/ アルブミンビーズ
エリスロシン (525)	1.70	1.48 (87)	0.085 (5)
EBV (600)	0.69	0.24 (35)	0.055 (8)
メチルオレンジ (465)	0.49	0.44 (90)	0.16 (33)
ローズベンガル (540)	0.61	0.60 (98)	0.105 (17)
タルトラジン (425)	0.955	0.91 (95)	0.88 (92)

a アルギン酸塩ビーズを含まない溶液の対応する容量
に於ける色素の吸光度。

【0021】表2(a)と2(b)からエリスロシン、EBV及びローズベンガルはアルギン酸カルシウム-カゼイン-色素ビーズとアルギン酸亜鉛-アルブミン-色素ビーズの両方に実質的な結合を示すことからわかる。更にその上、メチルオレンジはアルギン酸亜鉛-アルブミン-色素ビーズに著しい結合を示す。試験される色素5種類のうち、タルトラジンだけがアルギン酸カルシウム-カゼイン-色素ビーズとアルギン酸亜鉛-アルブミン-色素ビーズの両方から完全に放出された。

【0022】実施例2

アルギン酸塩ゲルビーズからカゼイン結合エリスロシンの放出

アルギン酸塩-カゼイン-エリスロシンビーズを実施例1に記載される通り調製した。1時間後、ビーズを汙別し、37℃に維持した水(20cm³)に再懸濁し攪拌を続けた。上澄みの525nmに於ける吸光度を間隔をおいて読み取った。約20.5時間後細菌の α -アミラーゼを含む溶液(200 μ l中1000単位)を加えた。21時間後にグルコアミラーゼを含む溶液(200 μ l、97.6 μ g)を加えた。25時間後にトリプシン(水200 μ l中177.6mg)を加えた。各々を添加した後525nmに於ける吸光度を読み取った。結果を図1に示す。図1からわかるようにこれらの酵素がプロテアーゼでないため α -アミラーゼ又はグルコアミラーゼの添

※加により色素の放出は実質的に起こらなかった。しかしながら、プロテアーゼトリプシンの添加により色素の上澄み液へ放出が直ちに急速に生じた。

【0023】実施例3

アルギン酸塩ビーズからカゼイン結合EBVの放出
蠕動ポンプを用いて、アルギン酸ナトリウム(1%)、カゼイン(1%)及びEBV(7.7 μ g、0.2mM)を含む溶液2.0mlを注射針により塩化カルシウム溶液(20cm³、2%)に滴下した。2.0ml押し出すのに必要とされる時間は3分20秒であった。ビーズを1~3時間CaCl₂溶液中に放置した後、汙別し、水約50mlですすいだ。次いでビーズのバッチを検定される酵素を含む緩衝液(10cm³)の入ったフラスコに入れた。間隔をおいて上澄みのアリコートを取り除き、600nmに於けるその吸光度を読み取った後迅速に置き換えた。図2はトリプシン(0.02Mトリス緩衝液中18.6 μ g、pH8.0)を用いたときの上澄み液の吸光度の経時増加を示す。色素放出率は時間に関して直線的に変化することが認められる。この実験を変温度のトリプシン(10cm³中6.2~43.4 μ g)を用いて繰り返す、各々の場合で上澄みの吸光度の増加率を得た。図3は色素の放出率が酵素濃度に関して直線的に変化したことを示す。またこの実験をキモトリプシン(0.02Mトリス緩衝液中、pH8.0)、カリクレイン(0.02Mトリス緩衝液中、pH8.75)、高アルカリ性プロテイナーゼHAP-PB92(0.02Mトリス緩衝

15

液中、pH8.5)及びエラスターゼ(0.02Mトリス緩衝液中、pH8.75)を用いて行なった。図4、5、6及び7は各々各場合に於ける酵素濃度による色素放出率の変化を示す。これらの各々の図は酵素濃度に対する色素放出率の予測し得る一般に直線的な変化を示す。

【0024】実施例4

アルギン酸塩ビーズからカゼイン結合テトラサイクリンの放出

テトラサイクリン(125 μ g/ml)、アルギン酸ナトリウム(1%)と変性カゼイン(1%)の溶液(5ml) 10をpH11の塩化カルシウム溶液(2%)に滴下して一組のテトラサイクリン-カゼイン-アルギン酸カルシウムビーズを調製した。4時間後、ビーズをpH8.0の0.02Mトリス緩衝液に移し、上澄みをテトラサイクリンのビーズからの放出に対して370nmに於て監視した。図8はテトラサイクリンの放出(取り込まれた全量の26%)が960分後に完了したことを示す。次いでトリプシン(200 μ l中142.5 μ g)を加え、またテトラサイクリンの放出を370nmに於て監視した。図8 20は更にそれ以後の100分後の放出(取り込まれた全量の71%まで)を示す。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1はアルギン酸カルシウム、カゼイン及びエリスロシンから調製したビーズから色素の放出を表わし、そして調製後 α -アミラーゼとグルコアミラーゼの添加し、次いでトリプシンの添加後の上澄みの吸光度を示す。

16

【図2】図2はトリプシンの作用によるアルギン酸カルシウム-カゼイン-E BVビーズから色素の放出を表わし、トリプシン添加後の上澄みの吸光度の経時変化を示す。

【図3】図3はトリプシンの作用によるアルギン酸カルシウム-カゼイン-E BVビーズから色素の放出を表わし、使用されるトリプシン濃度に対する色素の放出率の変化を示す。

【図4】図4はキモトリプシンの作用によるアルギン酸カルシウム-カゼイン-E BVから色素の放出を表わし、キモトリプシン濃度に対する色素の放出率の変化を示す。

【図5】図5はカリクレインの作用によるアルギン酸カルシウム-カゼイン-E BVビーズから色素の放出を表わし、カリクレイン濃度に対する色素放出率の変化を示す。

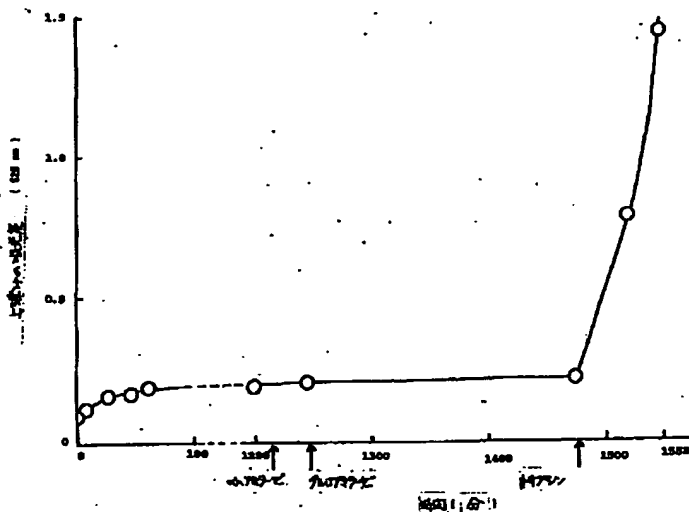
【図6】図6はHAP-PB92の作用によるアルギン酸カルシウム-カゼイン-E BVから色素の放出を表わし、プロテイナーゼ濃度に対する色素放出率の変化を示す。

【図7】図7はエラスターゼの作用によるアルギン酸カルシウム-カゼイン-E BVから色素の放出を表わし、エラスターゼ濃度に対する色素放出率の変化を示す。

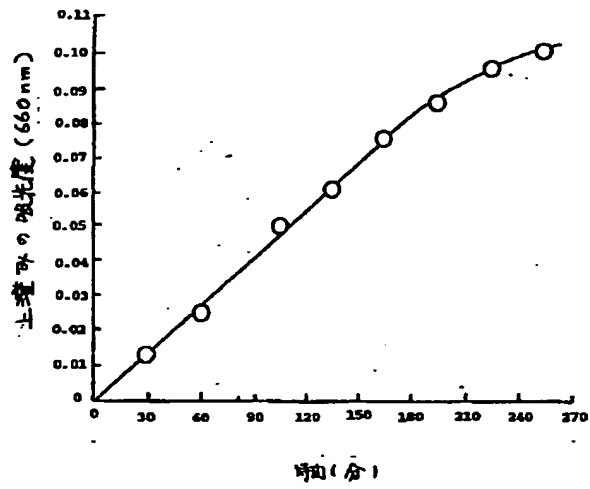
【図8】図8は370nmに於ける上澄みの吸光度を時間に対してプロットしてテトラサイクリン-カゼイン-アルギン酸カルシウムビーズからテトラサイクリンの放出を表わす。

【図1】

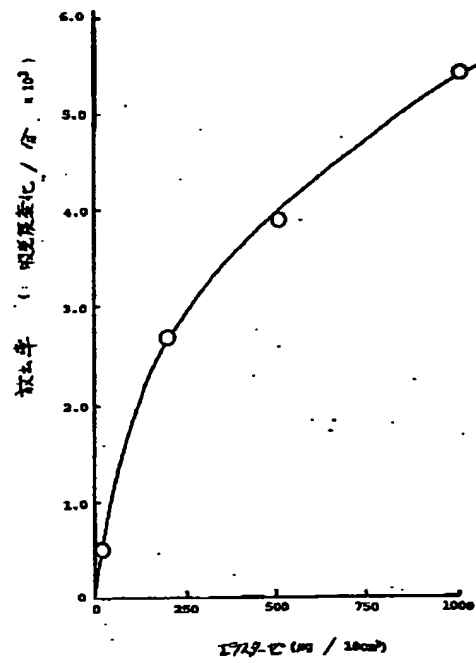
図 1.



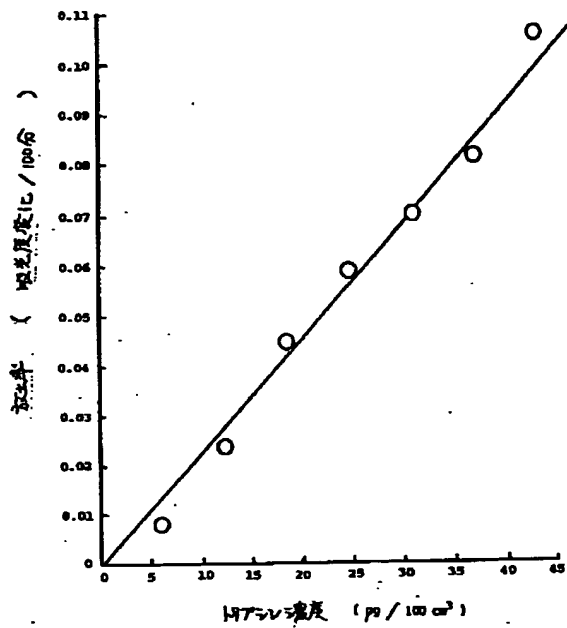
【図2】



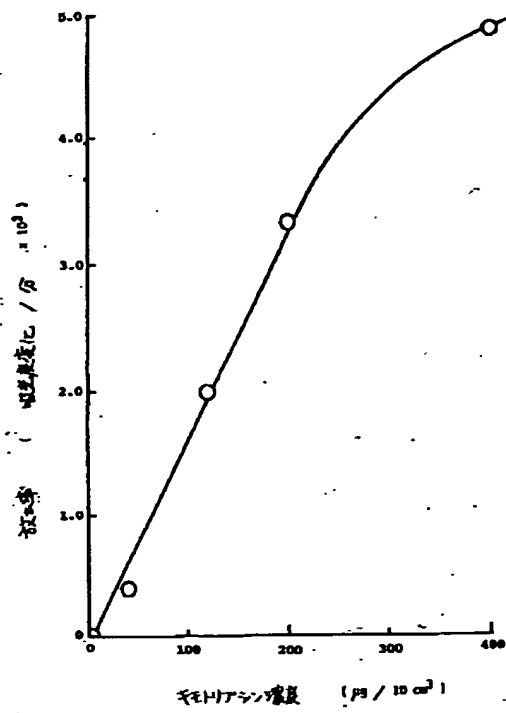
【図7】



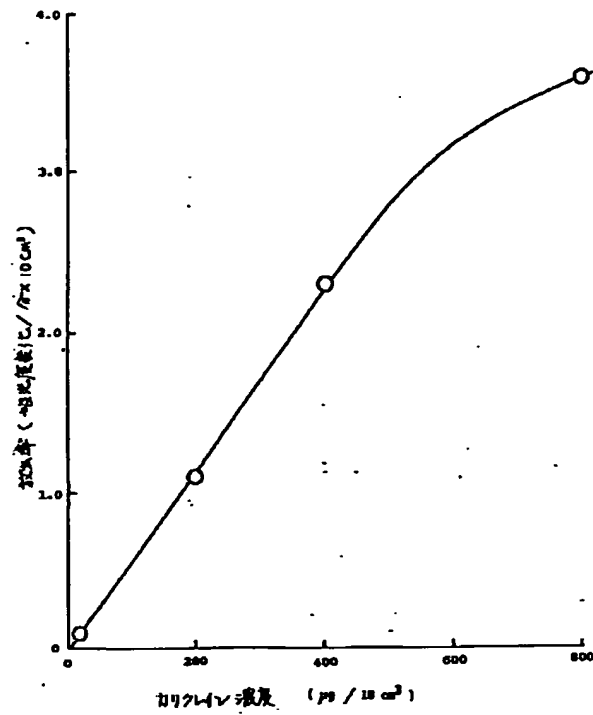
【図3】



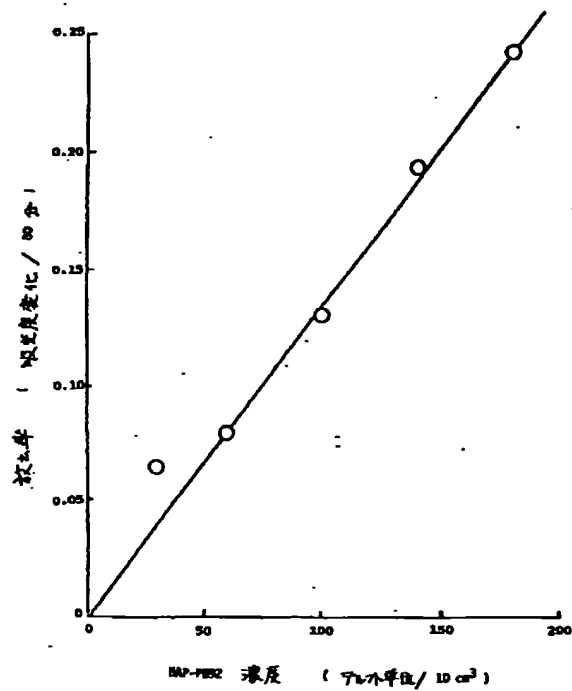
【図4】



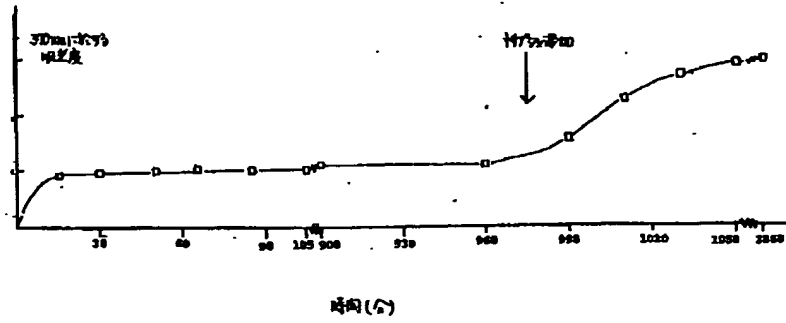
【図5】



【図6】



【図8】



【手続補正書】

【提出日】平成3年3月13日

【手続補正1】

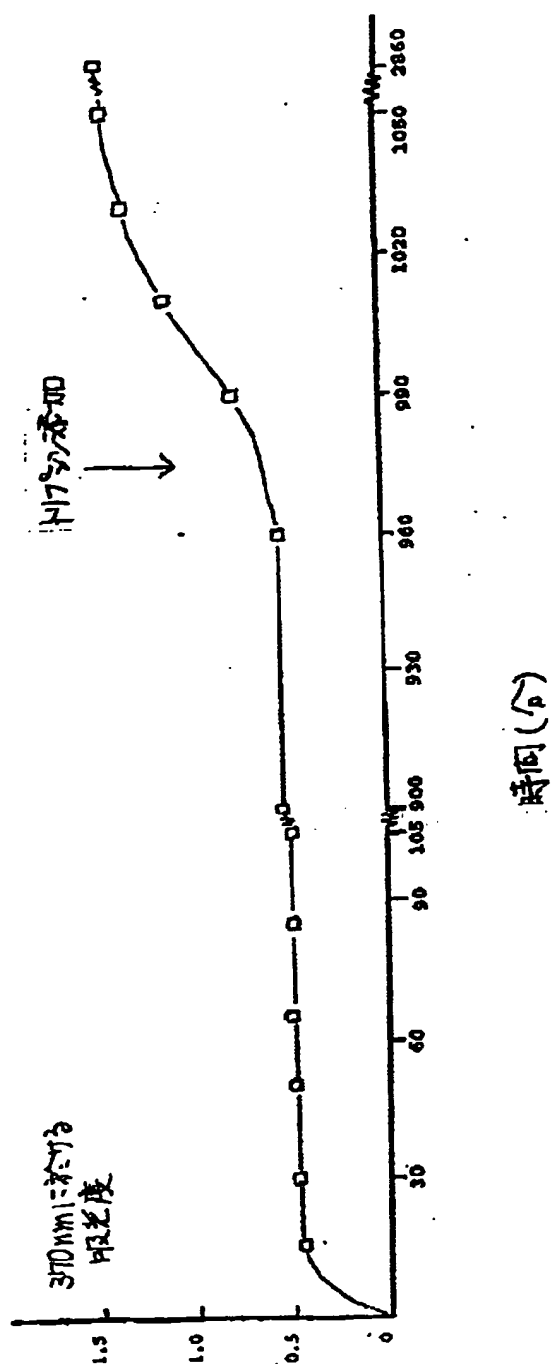
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図8

【補正方法】変更

【補正内容】

【図8】



【手続補正書】

【提出日】平成4年10月20日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】放出制御製剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ゲルマトリックス、
 ゲルマトリックスにからみついたタンパク質、及び
 からみついたタンパク質に結合することができる成分を
 包含し、この製剤がタンパク質分解酵素を含む条件と反
 応するときにタンパク質が分解され、成分がタンパク質

から酵素を含む条件に放出される放出制御製剤。

【請求項2】 成分が薬剤、抗生物質、ホルモン、ホルモン類似物又は化学療法剤又はその組合せである請求項1記載の製剤。

【請求項3】 タンパク質がカゼイン又は血清アルブミン又は他のゲルにからみつることができるタンパク質又はその組合せである請求項1記載の製剤。

【請求項4】 ゲルマトリックスがアルギン酸カルシウムゲルビーズを包含している請求項1記載の製剤。

【請求項5】 ゲルマトリックスがマグネシウム、亜鉛、銅、マンガン、アルミニウム又は鉄又はカルシウム、マグネシウム、亜鉛、銅、マンガン、アルミニウム又は鉄の混合物を有するアルギン酸塩ゲルビーズを包含している請求項1記載の製剤。

【請求項6】 ゲルマトリックスが膜、繊維又は管形を有する請求項1記載の製剤。

【請求項7】 ゲルがベクチン、ベクテート、カラゲニン、キサンタンゴム、グアゴム、アラビアゴム、アカシアゴム及びカルボキシメチルセルロースからなる群から選択される多糖類又はその混合物である請求項1記載の製剤。

【請求項8】 1種以上のタンパク質分解酵素を請求項1記載の放出制御製剤に添加することを特徴とする請求項1記載の成分の放出方法。

【請求項9】 タンパク質分解酵素がトリアシンである請求項8記載の方法。

【請求項10】 酵素が活性な患者の局所部位で成分が放出される請求項8記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】本発明は放出制御製剤に関する。更に詳細には本発明はゲルマトリックスに基づく製剤及びこの製剤の例えば放出制御医薬組成物、食品添加物の放出制御組成物又は診断用検定装置の成分としての種々の適用に関する。所望成分がゲルマトリックスから制御された方法で放出される種々の方法は当業界で既知である。例えば英国特許出願第2207353号は塩基性薬剤例えばベラパミルの放出制御に45重量%までのpH依存性アルギン酸塩例えばアルギン酸ナトリウム及び35重量%までのpH依存性ヒドロコロイドゲル化剤例えばヒドロキシアプロピルメチルセルロースを包含しているカルシウムを含まない製剤を記載している。架橋アルギン酸塩又はカラゲネン酸塩マトリックスにからみついた(entrapped)有効成分からなる送達系は欧州特許出願第0202819号に記載され、マトリックスからの有効成分の放出は延長及び抑制されることが述べられている。有効成分が単に架橋ゲルマトリックスにからみつくことによる製剤は種々の欠点をもっている。例えば直径がマトリックス孔より小さい分子、特に水溶性分子は製剤から“浸出する”明白な傾向がある。これは有効成分の放出を制御された方法で行なうことができる製剤の調製を困難にす

る。更にその上多くの薬剤のような高価な成分の場合、有効成分の製剤からの早期“浸出”は著しい経済的欠点である。そこで我々はゲルマトリックスにからみついたタンパク質に成分を結合させる製剤を提供することによってこれらの欠点を克服することができることを見出した。タンパク質結合成分はからみついたタンパク質の適当な基質であるタンパク質分解酵素と製剤が接触するような時までマトリックスと結合したままであり、その後タンパク質が分解して成分が放出される。

【0002】従って本発明の1態様として、ゲルマトリックス、ゲルマトリックスにからみついたタンパク質、及びからみついたタンパク質に結合することができる成分を包含し、この製剤がタンパク質分解酵素を含む条件と反応するときにタンパク質が分解され、成分が放出されることからなる放出制御製剤を提供する。“成分”とは製剤からの放出が制御された方法で行なわれることが望ましいいかなる物質をも意味する。適当な成分の具体例としては、毛虫撲滅剤、除草剤、殺菌剤(germicides, biocides)、殺藻剤、殺鼠剤、殺真菌剤、殺虫剤、抗酸化剤、植物生長促進剤、植物生長阻害剤、防腐剤、消毒剤、滅菌剤、触媒、化学反応剤、発酵剤、食品、食品補助剤、食品添加物、栄養素、化粧剤、薬剤、ビタミン剤、避妊薬、受精阻害剤、受精促進剤、空気清浄剤、微生物弱毒剤及び食品色素のような指示物質がある。からみついたタンパク質がタンパク質分解酵素に対して適当な基質であることが理解されなければ製剤から成分の放出は望ましい場所で起こらないであろう。またタンパク質は勿論ゲルマトリックスにからみつくなければならない。しかしながらこれらの要件の他にタンパク質及びタンパク質分解酵素の種類に関する制限は予想されない。タンパク質分解酵素は生存しているヒト又は動物体内に存在することができまた試験管内で分離及び/又は精製した形態で使用することができる。従って本発明による放出制御製剤は応用範囲に添うことができる。

【0003】従って本発明の別の態様としては、ゲルマトリックス、ゲルマトリックスにからみついたタンパク質、からみついたタンパク質に結合することができる薬剤、及び任意の医薬的に使用し得る賦形剤を包含し、この組成物がタンパク質分解酵素を含む条件と反応するときにタンパク質が分解され、薬剤が放出されることからなる放出制御医薬組成物を提供する。本明細書で用いられる“薬剤”とは哺乳類、ヒト及び霊長動物を含む動物に局部的又は全身作用を生じるあらゆる生理的及び薬理的有効物質を包含する。従って個々の動物としては羊、山羊、牛、馬及び豚のような家畜用、狩猟用又は農場用の動物及びマウス、ラット及びモルモットのような実験動物並びに魚、鳥、爬虫類及び他の動物園の動物を包含する。使用される薬剤の唯一の要件はからみついたタンパク質に対する結合能であることは理解されるであら

う。従って原則として使用し得るタンパク質が結合するであろうことがわかれればいかなる既知の薬剤も使用することができる。“使用し得るタンパク質”はゲルマトリックスにからみつくことができるタンパク質を意味する。有益な薬剤の具体例はマックパブリッシング社、イーストン、ペンシルバニア、米国によって発行されたレミントンズファーマソイチカルサイエンス、第17版、1985年及びマクミラン、ロンドンにより発行されたグッドマン及びギルマン、ザファーマコロジカルベシスオブセラポイクス、第7版、1985年に開示されている。

【0004】使用することができる有効な薬剤は末梢神経、アドレナリン作動性受容体、コリン作動性受容体、神経系、骨格筋、心臓血管系、平滑筋、血液循環系、シナプス部位、神経エフェクター結合部位、内分泌及びホルモン系免疫系、生殖系、骨格系、オタコイド系及び消化及び排泄系並びにオタコイドインヒビター及びヒスタミン系に作用する無機及び有機化合物を包含する。好適な薬剤の具体例としては中枢神経系に作用する物質例えばベントバルビタールナトリウム、フェノバルビタール、セコバルビタール、チオペンタール及びその組合わせを含む催眠薬及び鎮静剤；ジオキソビベリジン及びグルタルイミドのような複素環式催眠薬及び鎮静剤；ジエチルイソバレルアミド及び α -プロモイソバレル尿素に例示されるアミド及び尿素のような催眠薬及び鎮静剤；ウレタン及びジサルファン催眠薬及び鎮静剤；イソコボキサジド、ニアラミド、フェネルジン、イミプラミン、塩酸アミトリアチリン、トラニルシプロミン、パーズレン及び塩酸プロトリアチリンのような精神賦活薬；クロロプロマジン、プロマジン、フルフェナジン、レセルピン、デセルピジン、メプロバメート及びベンゾジアゼピン即ちクロルジアゼボキサジドのような精神安定剤；アリミドン、エニタバス、ジフェニルヒダントイン、エチルチオン、フェネツリド及びエトスキシイミドのような抗痙攣薬；メフェネシン、メトカルバモール、シクロベンザプリン、トリヘキシルフェニジル、レボドーパ/カルビドーパ及びビベリデンのような筋弛緩物質及び抗パーキンソン剤； α -メチルドーパ、L- β -3、4-ジヒドロキシフェニルアラニン及び α -メチルドーパ塩酸塩2水和物のピバロイルオキシエチルエステルのような抗高血圧剤；モルフィン、コデイン、メペリジン及びナロルフィンのような鎮痛薬；アスピリン、インドメタシン、インドメタシンナトリウム3水和物、サリチルアミド、ナプロキセン、コルチシン、フェノプロフェン、スリダック、ジフルニサル、ジクロフェナック、インドプロフェン及びサリチルアミドナトリウムのような解熱薬及び抗炎症剤；プロカイン、リドカイン、マエパイン、ビベロカイン、テトラカイン及びジブカインのような局所麻酔剤；アトロピン、スコボラミン、メトスコボラミン、オキシフェノニウム及びババペリンのような鎮

痙薬及び筋収縮剤；PGE₁、PGE₂、PGF₁ α 、PGF₂ α 及びPGAのようなプロスタグランジン類；ペニシリン、テトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、クロロテトラサイクリン、クロラムフェニコール、チアベンダゾール、イベルメクチン及びスルホンアミドのような抗菌剤及び駆虫剤；4-アミノキノリン、8-アミノキノリン及びピリメタミンのような抗マラリア剤；デキサメタゾン、アレドニゾロン、コルチゾン、コルチゾール及びトリアンシノロンのようなホルモン剤；メチルテストステロン及びフルオキシメステロンのようなアンドロゲンステロイド系；17 β -エストラジオール、 α -エストラジオール、エストリオール、 α -エストラジオール3-ベンゾエート及び17-エチニルエストラジオール-3-メチルエーテルのようなエストロゲンステロイド系；プロゲステロン、19-ノル-アレグネ-4-エン-3、20-ジオン、17-ヒドロキシ-19-ノル-17 α -アレグネ-5(10)-エン-20-イン-3-オン、17 α -エチニル-17-ヒドロキシ-5(10)-エストレン-3-オン及び9 β 、10 α -アレグナー-4、6-ジエン-3、20-ジオンのような月経前期ステロイド系；アドレナリン、塩酸フェニルプロパノールアミン、アンフェタミン、エフェドリン及びノルアドレナリンのような交感神経興奮剤；ヒドララジンのような血圧降下剤；プロカインアミド、塩酸プロカインアミド、硝酸アミル、ニトログリセリン、ジビリダモール、硝酸ナトリウム及び硝酸マンニトールのような心臓血管剤；クロロチアジド、アセタゾールアミド、メタゾールアミド、ヒドロクロロチアジド、塩酸アミロリド、フルメチアジド、エタクリン酸及びフロセミドのような利尿剤；ベフェニウム、ヒドロキシナフトエート、ジクロロフェン及びダブソンのような駆虫剤；メクロールエタミン、ウラシルマスタード、5-フルオロウラシル、6-チオグアニン及びプロカルバジンのような新生物剤；ピンドロール、プロアラノール、ブラクトロール、メトプロロール、オキシブレノロール、チモロール、マレイン酸チモロール、アテノロール、アルブレノロール及びアセプトロールのような β -遮断薬；インシュリン、イソファンインシュリン、プロタミン亜鉛インシュリン懸濁液、グロビン亜鉛インシュリン、伸長インシュリン亜鉛懸濁液、トルブタミド、アセトヘキサミド、トラザミド及びクロルプロバミドのような低血糖剤；シメチジン及びラニチジンのような抗潰瘍剤；アスコルビン酸、ナイアシン、ニコチンアミド、葉酸、コリン、ビオチン、パントテン酸及びビタミンB₁₂のような栄養剤；必須アミノ酸；必須脂肪；チモロール、マレイン酸チモロール、ピロカルピン、硝酸ピロカルピン、塩酸ピロカルピン、ジクロールフェナミド、アトロピン、硫酸アトロピン、スコボラミン及びサリチル酸エゼリンのような眼薬；グルコン酸カルシウム、乳酸カルシウム、塩化カリウム、硫酸カリウム、塩化ナトリウム、フ

ッ化カリウム、フッ化ナトリウム、乳酸第一鉄、グルコン酸第一鉄、硫酸第一鉄、フマル酸第一鉄及び乳酸ナトリウムのような電解質； α -アドレナリン受容体に作用する薬剤例えば塩酸クロニジン及びキノリン及びナフチリジンカルボン酸がある。好ましい薬剤としてはテトラサイクリン系、特にクロロテトラサイクリン、デメクロサイクリン及びテトラサイクリンそのものを包含する。

【0005】薬剤は非電荷分子、分子複合体及び塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、ラウリル酸塩、パルミチン酸塩、リン酸塩、硝酸塩、ホウ酸塩、酢酸塩、マレイン酸塩、オレイン酸塩及びサリチル酸塩といった医薬的に使用し得る塩のように種々の形態であることができる。酸薬剤の場合は金属アミン又は有機カチオンの塩例えば第四級アンモニウム塩を用いることができる。好適な溶解度特性をもつエステル、エーテル及びアミドのような薬剤の誘導体は単独で用いるかまたは他の薬剤と混合することもできる。更にその上水不溶性薬剤はその水溶性誘導体形態で使用することができ、組成物からの遊離により酵素によって変換されるか又は体内pH又は他の代謝過程によってもとの形に又はその生物学的に活性な形態に加水分解される。組成物に混合される薬剤量は関与する薬剤の種類及び治療される疾病の程度等の要因による。一般に最終組成物0.05～60重量%量が適当であり5.0～50%が好ましい。

【0006】任意の医薬的に使用し得る賦形剤は組成物の製造を助け、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、タルク及びソルビトールのような通常の物質を包含する。本発明による医薬組成物の顕著な利点は部位特異性である。従ってゲルマトリックスにはめ込まれるタンパク質の適当な選択によって組成物はタンパク質が基質である特定の酵素にぶつかるまで体内を通過する際そのままであるように処方することができる。この点でのみタンパク質が分解し、薬剤が放出される。従って薬剤は活性を意図した部位を正確に目標とすることができ、薬剤と体内の他の部位との相互作用による不利な副作用を最小にすることができる。薬剤の胃腔への放出を最小にすることを確実にするために、組成物は通常の腸溶層で供給することができる。腸溶層又は腸溶皮に対して種々の物質を用いることができ、このような物質としては多くの重合体酸及び重合体とセラック、セチルアルコール及びセルロースアセテートのような物質を包含する。本発明は経口投与し得る医薬組成物に限定されず、その範囲内には局所、直腸及び非経口投与のための医薬組成物を同様に包含する。組成物は好ましくは錠剤、丸剤、カプセル剤、坐薬、散剤、顆粒剤又は無菌の非経口液剤又は懸濁液剤のような単位投薬形にあり、例えばレミントンズファーマソイチカルサイエンス、第17版、1985年に記載される当業界で既知の方法によって処方することが便利である。

【0007】別の態様として本発明は、ゲルマトリック

ス、ゲルマトリックスにからみついたタンパク質、及びからみついたタンパク質に結合することができる食品添加物を包含し、この組成物がタンパク質分解酵素を含む条件と反応するときにタンパク質が分解され、食品添加物が放出されることからなる食品添加物の放出制御のための組成物を提供する。”食品添加物”とは本明細書では最も広い意味で用いられる。特にこの表現は香味剤、香料、着色剤及び甘味剤及びその組合わせのようなものを包含する。前のように唯一の要件は食品添加物がからみついたタンパク質に結合することができるというものである。本発明による食品添加物を含む組成物は、種々のチューインガムを含む製品又は賦形剤及び菓子類、食品、タバコ及び鑢り歯磨及び義歯接着剤のような専売品に使用することができる。この組成物は延長した時間で漸次香味の放出を必要とする製品に特に十分に適合する。従って最初に短時間かんだだけで急速に香味感覚が失われることがよく知られているチューインガムのような製品に持続した香味を与えるために特に有利に使用することができる。上の組成物が適用される他の事情としては加工サイクルの期間中持続して一定の成分を放出することが望まれる食品加工業及び特定の香味成分が不安定で分解しやすい事情を包含する。例えばドライミックスデザートは不安定な香味成分を含ませることができ、この場合には関与する成分はミルクを加えるときにそのまま放出されるべきであり、製品の使用前に分解されないことが望ましいことは明白である。

【0008】食品添加物として有用な香味剤の具体例としては、合成香味油、フルーツエッセンス及び植物、葉及び花のような原料から誘導される天然香味油並びにこれらの組合わせを包含する。個々の具体例としてはミドリハッカ油、ハッカ油、ケイヒ油及びアカモノ油（サリチル酸メチル）；レモン、オレンジ、グレープ、ライム及びグレープフルーツのような原料から誘導されるシトラス油；リンゴ、イチゴ、チェリー及びパイナップルのような原料から誘導されるフルーツエッセンス及びコラエキスのようなエキスがある。使用される香味剤の量は通常所望される香味種、ベース種及び強度のような要因を受けやすい好みの問題である。一般に最終組成物の0.05～3.0重量%の量が適当であり、0.3～1.5%の量が好ましく、0.7～1.2%が特に好ましい。有用な着色剤及び芳香剤は特にカーク-オマーズエンサイクロペディアオブケミカルテクノロジー、第5巻、第857～884頁に記載される食品、薬剤及び化粧剤用に適しているものから選択することができる。これらは1重量%まで好ましくは0.6重量%までの量で混合することができる。適当な甘味剤としては単糖類、二糖類及び多糖類例えばキシロース、リボース、グルコース、マンノース、ガラクトース、フルクトース、デキストロース、スクロース、転化糖、マルトース、部分的加水分解デンプン又はコーンシロップ固形分及び糖アル

コール類例えばソルビトール、キシリトール、マンニトール、ジヒドロカルコン、グリシリジン及びステビアレバウジアナ(ステビオニド)のような水溶性天然甘味剤;可溶性サッカリン塩即ち、サッカリンナトリウム又はカルシウム塩、シクラメート塩、サッカリンの遊離酸体及び合成甘味剤3, 4-ジヒドロ-6-メチル-1, 2, 3-オキサチアジン-4-オン2, 2-ジオキシド、特にそのカリウム(アセスルファメ-K)、ナトリウム及びカルシウム塩のような水溶性人工甘味剤; L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステルのようなジペプチドベース甘味剤;及びその混合物を包含する。一般に用いられる甘味剤の量は個々の組成物の所望の甘味によって異なる。この量は容易に抽出し得る甘味剤を用いるとき通常0.01~90重量%である。水溶性の天然甘味剤は好適には最終組成物の25~75重量%、特に50~65重量%の量で用いられる。対照的に水溶性の人工甘味剤及びジペプチドベース甘味剤は好適には最終組成物の0.01~5.0重量%特に0.05~0.5重量%の量で用いられる。これらの量は香油から得られる香味レベルと独立して所望の甘味レベルを得ることを必要とする。

【0009】本発明による放出制御製剤の組成の適当な選択によって成分のタンパク質分解酵素を含む条件への放出が時間に関してまたタンパク質分解酵素の濃度に関して直線的にすることができることを見出した。このようにして成分の典型的組成物からの放出を検定することができる。従って本発明による製剤の別の適用は診断用検定装置の成分としてのものである。従って別の態様として本発明は、ゲルマトリックス、ゲルマトリックスにからみつけたタンパク質、及びからみつけたタンパク質に結合することができる指示物質を包含し、この成分がタンパク質分解酵素と反応するときにタンパク質が分解され、指示物質が放出されることからなる診断用検定装置の成分を提供する。使用する場合、上で定義した成分は適当な容器中液体例えば水のような適当な媒質中に入れられる。検定によって決定されるタンパク質分解酵素量を含む試料は既に上澄み液に存在するか又は順次導入される。成分中からみつけたタンパク質は検定試料のタンパク質分解酵素の濃度による指示物質の直線的放出を得るように選択される。タンパク質分解酵素によりからみつけた基質タンパク質が分解する際、指示物質はタンパク質分解酵素の濃度によって決定された割合で上澄み液に放出される。次いで指示物質の上澄み液への放出は当業界で既知の適当なセンサー手段によって監視されて、もとの検定試料のタンパク質分解酵素濃度の正確な指示を得る。

【0010】本発明による診断用検定成分で用いるのに適した指示物質は、色素生成分子、蛍光発生分子及び蛍光分子を包含する。これらの物質の上澄み液への放出は蛍光及び発光の蓄積を生じ、通常の化学ルミネッセンス

装置のような適当なセンサー手段によって検出、監視することができる。個々の指示物質としてはエリスロシン、エバンスブルーバイタル(EBV)、メチルグリーン、ローズベンガル、アクリジンオレンジ、トロパエオリンOO、メチルオレンジ、酸オレンジ12、アミドブラック10B、カルミン酸ナトリウム塩、カルモシン、タートラジン及びメチレンブルー、特にエリスロシン及びEBVのような食品色素を包含する。検定成分に存在する指示物質の量は一般に用いられる検出手段によって観察される強度による。一般に使用される量は最終成分の0.001~0.2重量%、好ましくは0.01~0.04%で適当に異なる。上述の検定成分は検定されるタンパク質分解酵素がトリプシン、キモトリプシン、カリクレイン、高アルカリ性プロテアーゼ(HAP、特にHAP-PB92)及びエラスターゼのようなエンドプロテアーゼであるとき特に十分に即ち最適な直線関係を得るように作用することを見出した。検定されるタンパク質分解酵素がエキソプロテアーゼ例えばカルボキシペプチダーゼ又はアミノペプチダーゼであるとき、検定成分はなお有効であるが、開始時間の遅れを受ける。これはからみつけたタンパク質が1度に1種のアミノ酸だけを分解するので指示物質が結合する個々のアミノ酸に達する時間まで指示物質が媒質中に放出されないためである。

【0011】本発明による放出制御製剤に存在させるゲルマトリックスはゲル化する多糖類が適当である。適当なゲル化する多糖類の具体例としてはカルボキシメチルセルロース、カラゲニン、グアゴム、アラビアゴム(gum arabic, gum acacia)及びポリウロネートを包含する。個々のポリウロネートとしてはアルギン酸塩、ペクチン酸塩及びキサンタンゴム、好ましくはアルギン酸塩を包含する。藻から誘導されるアルギン酸塩は4,000~約18,000の分子量を有するD-マンヌロン酸とL-グルロン酸の長鎖共重合体である。ゲル化特性を表わすためにアルギン酸塩は多価カチオンを含む塩の形態でなければならない。適当な多価カチオンの具体例としてはカルシウム、マグネシウム、亜鉛、銅、マンガン、アルミニウム及び鉄及びその組合せを包含する。好ましい多価カチオンはカルシウム及び亜鉛及びその組合せである。アルギン酸塩の1価の塩は水溶性であり、従ってゲル化に直接使用されない。しかしながら1価のカチオンは多価カチオンに容易に置き換えられるので1価のアルギン酸塩はゲル化する多価アルギン酸塩への有用な前駆体として働くことができる。ゲル化剤として多価アルギン酸塩を用いることに由来する別の利点は使用される多価カチオンが有効成分を結合するのに助けることができることである。例えばテトラサイクリンは2価の金属イオン特にCa²⁺イオンに結合することがよく知られており、この結合はテトラサイクリン分子がからみつけたタンパク質に結合すると共にゲルマトリックスの全体

の完全性に有利に寄与する。

【0012】本発明による放出制御製剤の使用に適当なタンパク質の具体例としてはカゼイン及びアルブミンを包含する。これらの各タンパク質は種々の成分に結合することができ、エンドプロテアーゼによって分解可能であり、制御された方法で有効成分を放出することができる。アルブミンの使用はこのタンパク質が多くの薬剤と複合体を生成することが既知であるため特に有利である。アルブミンをからみついたタンパク質として用い、ゲル化剤が多価アルギン酸塩である場合、この多価カチオンは Zn^{2+} が有利である。またカゼインをからみついたタンパク質として用い、ゲル化剤が多価アルギン酸塩である場合、使用されるカチオンは Ca^{2+} 又は Zn^{2+} 又はその組合わせが有利である。

【0013】本発明による放出制御製剤の外観は一般に関与する個々の製剤が置かれる適用によって決定される。従ってこの製剤は適切な技術で通常用いられる適当な形として存在させることができる。代表的な形としてはビーズ、ペレット、膜、繊維及び管を包含する。このような形の製造には例えばレミントンズファーマソイカルサイエンス、第17版、1985年に記載される標準技術を使用することができる。更にその上、製剤をビーズ又はペレットの形で存在させる場合、これらは当業界で既知の方法によって調製される硬ゼラチンカプセルに含ませることが有利である。典型的なビーズ又はペレットは直径0.5~4mmであり、これは直径4mm以上の粒子から生成される組成物が胃に停滞する傾向があるため局所的な望ましくない副作用を生じる可能性があることから医薬用途に特に有利である。

【0014】更に本発明は製剤からの放出が制御された方法で行なわれることが好ましいタンパク質とこれに結合することができる成分をゲル化剤と混合し、後者が結合した成分と一緒にタンパク質にからみついたゲルマトリックスを生成することを特徴とする上で定義した放出制御製剤の製造方法を提供する。上述した方法で用いられる成分の割合は最終生成物に必要とされるものに反映される。最終製剤に混合する適当な有効成分の量は既に上に示されている。有利に使用されるタンパク質に対するゲル化剤の割合は0.5:1~10:1(重量)、好ましくは1:1(重量)である。使用されるゲル化剤が多価アルギン酸塩である場合、ゲル基質は対応する1価アルギン酸塩例えばナトリウム、カリウム又はリチウム塩の水溶液を多価カチオン、好ましくは塩化カルシウム又は塩化亜鉛のような2価カチオンの水溶液に滴下することが便利である。タンパク質と有効成分は1価のアルギ

ン酸塩溶液と一緒に又は別々に加えるか又は多価カチオン溶液に既に存在させることができる。1価のアルギン酸塩溶液の滴下が多価カチオン溶液に接触するとゲルマトリックスが速かに生成し、これは結合される成分と一緒にタンパク質にからみついている。この方法の利点は滴下サイズを十分緊密な接触やイオン交換を確実にする好ましい範囲内で調節することができることから最終生成物の混合が不要であることである。1価のアルギン酸塩と多価カチオンは化学量論量で混合することができるが、多価カチオンはゲルマトリックス構造内で1価カチオンを多価カチオンに実質的に完全に置き換えることを確実にするために過剰に存在させることが好ましい。従って1価のアルギン酸塩水溶液の適当な濃度は0.25~2.0重量%好ましくは1.0重量%であり、一方多価カチオンの水溶液の適当な濃度は0.5~4.0重量%好ましくは1.0~2.0重量%であることができる。成分の混合はタンパク質結合成分が揮発する温度より低い温度で行なわれることが最良である。添加は1℃~25℃の温度で好ましくは室温で行なわれることが便利である。ゲルマトリックスが生成されれば次に沈殿を浮別、洗浄及び乾燥することができる。ゲルマトリックスの乾燥は室温で風乾、又は凍結乾燥又はこれらの手法の併用といった常法で行なうことができる。一般に乾燥は25℃以下の温度で行なわれるのが最良であり、タンパク質結合成分の揮発点以上の温度に於ける乾燥が勧められないことは明瞭である。乾燥されれば得られた製剤は次に上述した適当なサイズと形をした粒子に形成することができる。そこで本発明の個々の実施態様は実施例によって更に添付の図面について記載される。

【0015】予備実施例A

アルギン酸塩ゲルビーズに於けるタンパク質の保持
水酸化ナトリウム水溶液(150cm³、0.033M)中カゼイン(5.0g)の溶液を10分間煮沸した後、冷却し、2M塩酸でpH6.0に調整し、水で250cm³に希釈し、再び0.05M塩酸でpH6.0に調整した。この溶液とアルギン酸ナトリウム溶液(2.0%w/v)の同量(各々2.5cm³)の混合液を注射針により10.0cmの高さから2%(w/v)塩化カルシウム溶液(50ml)の溶液に滴下して押出した。ビーズを形成し、上澄みの280nmに於ける吸光度を直ちに読み取り、次に間隔をおいて20時間読み取った。この実験を塩化亜鉛溶液を用い、またカゼインの代わりにウシ血清アルブミン(BSA)を用いて繰り返した。結果を以下の表1に示す。

【0016】

表1

アルギン酸亜鉛及びアルギン酸カルシウムビーズに於けるウシ血清アルブミンとカゼインの保持

ビーズ中に保持されるタンパク質

	アルギン酸塩/アルブミン		アルギン酸塩/カゼイン	
	アルギン酸 亜鉛 ^b	アルギン酸 カルシウム ^c	アルギン酸 亜鉛 ^b	アルギン酸 カルシウム ^c
調製直後	93	56	100	99
調製1時間後	91	24	99	99
調製2時間後	91	8	98	99
調製20時間後	91	8	93	90

a 示された時間で上澄みに出なかったビーズ内に取り込まれたタンパク質の%

b ビーズの調製に使用した塩化亜鉛溶液はpH5.5とした。

c ビーズの調製に使用した塩化カルシウム溶液はpH6.0とした。

【0017】表1から、アルギン酸カルシウムビーズに取り込まれたカゼインは長時間にわたって保持されることがわかる。アルギン酸カルシウム-カゼインビーズの上澄みによる280nmに於ける吸光度測定値は最初の2時間は実質的にペプチド又はタンパク質の漏出を示さなかった。対照的にビーズに取り込まれたアルブミンは90%以上が2時間で拡散した。一方、カゼイン及びアルブミン共にアルギン酸亜鉛ビーズ中では有効に保持される。

【0018】実施例1

色素のアルギン酸塩及びアルギン酸塩/タンパク質ゲル

ビーズへの取り込み

1%アルギン酸ナトリウム、1%カゼイン及びエリスロシン200 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ を含む溶液を予備実施例Aで記載した通り2%塩化カルシウムに滴下した。1時間後525nmに於ける吸光度を読み取り、エリスロシン200 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ を単独で塩化カルシウム溶液に滴下することによって得た溶液の吸光度と比較した。この後者は取り込まれた色素0に名目上相当する対照とした。この実験をカゼイン非存在下で繰り返し、またカゼインの存在又は非存在下でエリスロシンの代わりにEBV、メチルオレンジ、ローズベンガル又はタルトラジンをを用いて繰り返し、上澄みの吸光度を適当な波長で読み取った。結果を以下の表2(a)に示す。またこの系を塩化カルシウムの代わりに塩化亜鉛、カゼインの代わりにアルブミンを用いて繰り返した。得られた結果を以下の表2(b)に示す。

【0019】

表2

アルギン酸塩及びアルギン酸塩/タンパク質ビーズから色素の放出
(a) アルギン酸カルシウム及びアルギン酸カルシウム/カゼインビーズ

色素 (λ_{max} nm)	吸光度 標準 ^a	調製1時間後に放出された色素に 基づく上澄みの吸光度(標準の%)	
		アルギン酸カルシウム ビーズ	アルギン酸 カルシウム/カゼイン ビーズ
エリスロシン (525)	1.68	1.34(80)	0.11(7)
EBV (600)	0.465	0.33(71)	0.08(17)
メチルオレンジ (465)	0.48	0.39(81)	0.40(83)
ローズベンガル (540)	0.73	0.60(90)	0.185(25)
タルトラジン (425)	0.97	0.955(98)	0.955(98)

a アルギン酸ビーズを含まない溶液の対応する容量に
於ける色素の吸光度。 【0020】

(b) アルギン酸亜鉛及びアルギン酸亜鉛/アルブミンビーズ

色素 (λ_{\max} nm)	吸光度 標準 ^a	調製1時間後に放出された色素に よる上澄みの吸光度(標準の%)	
		アルギン酸亜鉛 ビーズ	アルギン酸亜鉛/ アルブミンビーズ
エリスロシン (525)	1.70	1.48(87)	0.085(5)
EBV (600)	0.69	0.24(35)	0.055(8)
メチルオレンジ (465)	0.49	0.44(90)	0.16(33)
ローズベンガル (540)	0.61	0.60(98)	0.105(17)
タルトラジン (425)	0.955	0.91(95)	0.88(92)

a アルギン酸ビーズを含まない溶液の対応する容量
に於ける色素の吸光度。

【0021】表2(a)と2(b)からエリスロシン、EBV及びローズベンガルはアルギン酸カルシウム-カゼイン-色素ビーズとアルギン酸亜鉛-アルブミン-色素ビーズの両方に実質的な結合を示すことからわかる。更にその上、メチルオレンジはアルギン酸亜鉛-アルブミン-色素ビーズに著しい結合を示す。試験される色素5種類のうち、タルトラジンだけがアルギン酸カルシウム-カゼイン-色素ビーズとアルギン酸亜鉛-アルブミン-色素ビーズの両方から完全に放出された。

【0022】実施例2

アルギン酸塩ゲルビーズからカゼイン結合エリスロシンの放出

アルギン酸塩-カゼイン-エリスロシンビーズを実施例1に記載される通り調製した。1時間後、ビーズを汙別し、37℃に維持した水(20cm³)に再懸濁し攪拌を続けた。上澄みの525nmに於ける吸光度を間隔をおいて読み取った。約20.5時間後細菌の α -アミラーゼを含む溶液(200 μ l中1000単位)を加えた。21時間後にグルコamilラーゼを含む溶液(200 μ l、97.6 μ g)を加えた。25時間後にトリプシン(水200 μ l中177.6mg)を加えた。各々を添加した後525nmに於ける吸光度を読み取った。結果を図1に示す。図1からわかるようにこれらの酵素がプロテアーゼでないため α -アミラーゼ又はグルコamilラーゼの添加により色素の放出は実質的に起こらなかった。しかしながら、プロテアーゼトリプシンの添加により色素の上澄み液へ放出が直ちに急速に生じた。

【0023】実施例3

アルギン酸塩ビーズからカゼイン結合EBVの放出
蠕動ポンプを用いて、アルギン酸ナトリウム(1%)、カゼイン(1%)及びEBV(7.7 μ g、0.2mM)を含む溶液2.0mlを注射針により塩化カルシウム溶液(20cm³、2%)に滴下した。2.0ml押し出すのに必要とされる時間は3分20秒であった。ビーズを1~3時間CaCl₂溶液中に放置した後、汉別し、水約50mlですすいだ。次いでビーズのバッチを検定される酵素を含む緩衝液(10cm³)の入ったフラスコに入れた。間隔をおいて上澄みのアリコートを取り除き、600nmに於けるその吸光度を読み取った後迅速に置き換えた。図2はトリプシン(0.02Mトリス緩衝液中18.6 μ g、pH8.0)を用いたときのの上澄み液の吸光度の経時増加を示す。色素放出率は時間に関して直線的に変化することが認められる。この実験を可変濃度のトリプシン(10cm³中6.2~43.4 μ g)を用いて繰返し、各々の場合で上澄みの吸光度の増加率を得た。図3は色素の放出率が酵素濃度に関して直線的に変化したことを示す。またこの実験をキモトリプシン(0.02Mトリス緩衝液中、pH8.0)、カリクレイン(0.02Mトリス緩衝液中、pH8.75)、高アルカリ性プロテイナーゼHAP-PB92(0.02Mトリス緩衝液中、pH8.5)及びエラスターゼ(0.02Mトリス緩衝液中、pH8.75)を用いて行なった。図4、5、6及び7は各々各場合に於ける酵素濃度による色素放出率の変化を示す。これらの各々の図は酵素濃度に対する色素放出率の予測し得る一般に直線的な変化を示す。

【0024】実施例4

アルギン酸塩ビーズからカゼイン結合テトラサイクリンの放出

テトラサイクリン ($125 \mu\text{g} / \text{ml}$)、アルギン酸ナトリウム (1%) と変性カゼイン (1%) の溶液 (5ml) を pH 1.1 の塩化カルシウム溶液 (2%) に滴下して一組のテトラサイクリン-カゼイン-アルギン酸カルシウムビーズを調製した。4時間後、ビーズを pH 8.0 の 0.02 M トリス緩衝液に移し、上澄みをテトラサイクリンのビーズからの放出に対して 370nm に於て監視した。図8はテトラサイクリンの放出 (取り込まれた全量の26%) が960分後に完了したことを示す。次いでトリプシン ($200 \mu\text{l}$ 中 $142.5 \mu\text{g}$) を加え、またテトラサイクリンの放出を 370nm に於て監視した。図8は更にそれ以後の100分後の放出 (取り込まれた全量の71%まで) を示す。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1はアルギン酸カルシウム、カゼイン及びエリスロシンから調製したビーズから色素の放出を表わし、そして調製後 α -アミラーゼとグルコアミラーゼの添加し、次いでトリプシンの添加後の上澄みの吸光度を示す。

【図2】図2はトリプシンの作用によるアルギン酸カルシウム-カゼイン-E BVビーズから色素の放出を表わし、トリプシン添加後の上澄みの吸光度の経時変化を示す。

す。

【図3】図3はトリプシンの作用によるアルギン酸カルシウム-カゼイン-E BVビーズから色素の放出を表わし、使用されるトリプシン濃度に対する色素の放出率の変化を示す。

【図4】図4はキモトリプシンの作用によるアルギン酸カルシウム-カゼイン-E BVから色素の放出を表わし、キモトリプシン濃度に対する色素の放出率の変化を示す。

【図5】図5はカリクレインの作用によるアルギン酸カルシウム-カゼイン-E BVビーズから色素の放出を表わし、カリクレイン濃度に対する色素放出率の変化を示す。

【図6】図6はHAP-PB92の作用によるアルギン酸カルシウム-カゼイン-E BVから色素の放出を表わし、プロテナーゼ濃度に対する色素放出率の変化を示す。

【図7】図7はエラスターゼの作用によるアルギン酸カルシウム-カゼイン-E BVから色素の放出を表わし、エラスターゼ濃度に対する色素放出率の変化を示す。

【図8】図8は 370nm に於ける上澄みの吸光度を時間に対してプロットしてテトラサイクリン-カゼイン-アルギン酸カルシウムビーズからテトラサイクリンの放出を表わす。

【手続補正書】

【提出日】平成4年10月20日

【手続補正2】

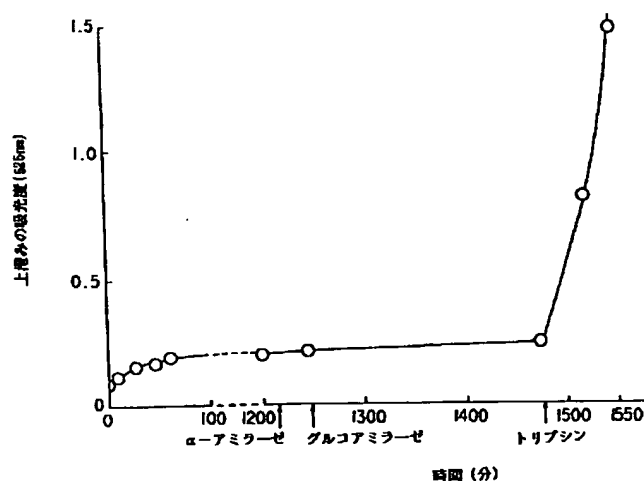
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

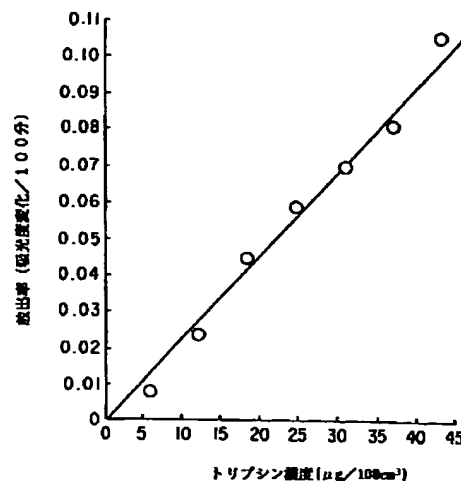
【補正方法】変更

【補正内容】

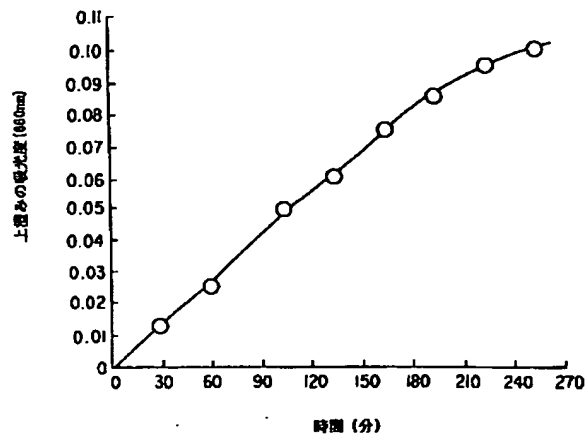
【図1】



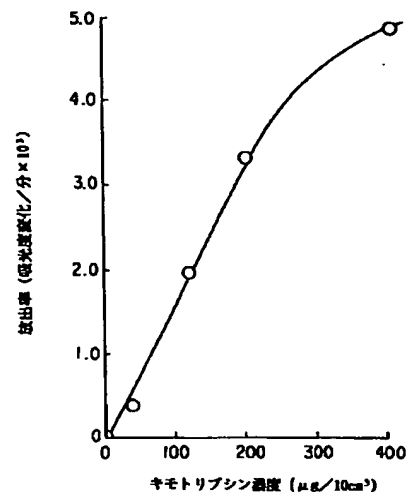
【図3】



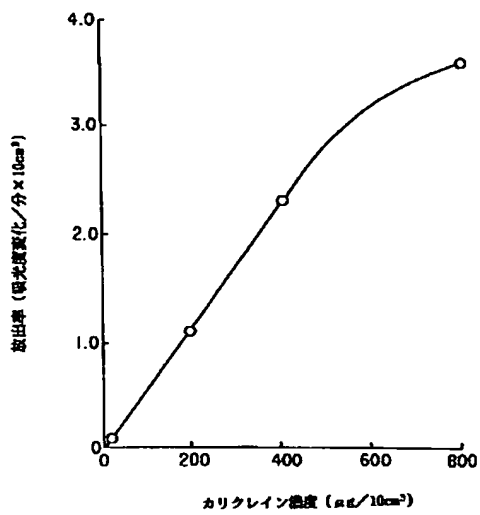
【図2】



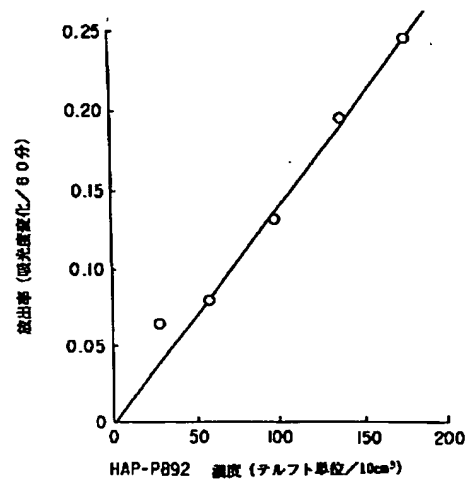
【図4】



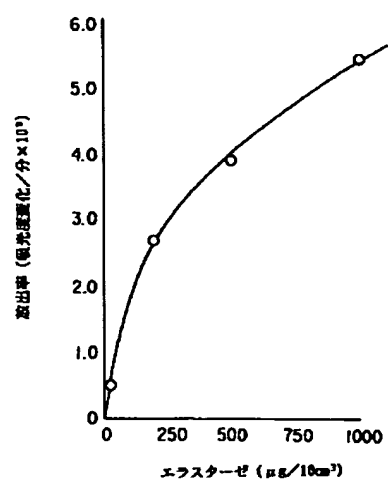
【図5】



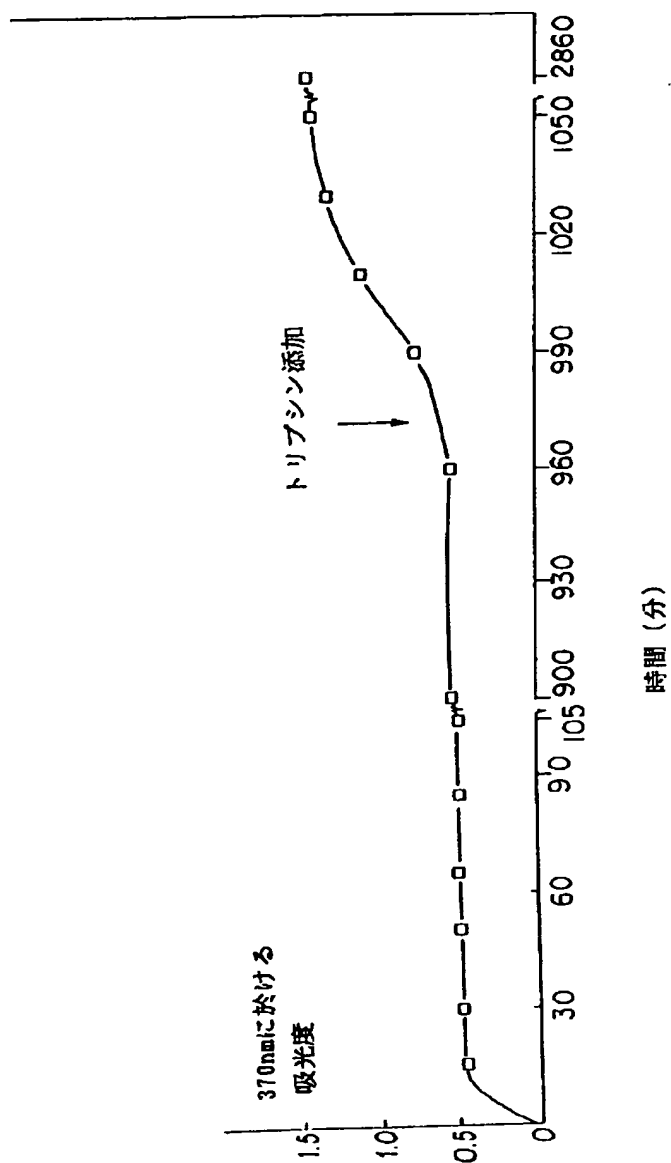
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(72)発明者 チャールズ ジョン グレイ
イギリス国、ビー28 ジェーエー パーミ
ンガム、ホール グリーン、スクール ロ
ード 66

(72)発明者 マーティン ホフマン
イギリス国、ジーエル5 1エスエス ス
トラウド、バーチエス ドライヴ、ザ バ
ーチエス、コーナー コテージ (番地なし)